

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización de subpoblaciones de Th17 en sangre periférica de pacientes con periodontitis agresiva

Johanna Carolina Camacho Ramírez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Odontología

Bogotá D.C., Colombia

2017

Caracterización de subpoblaciones de Th17 en sangre periférica de pacientes con periodontitis agresiva

Johanna Carolina Camacho Ramírez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de:

Especialista en Periodoncia

Director (a):

Dra. Lina Suárez

Odontóloga, Periodoncista MSc

Codirector (a):

Dra. Nelly Roa

Odontóloga, MSc, PhD

Línea de Investigación:

Inmunopatogenesis de las enfermedades periodontales

Grupo de Investigación:

Gerodontología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Odontología

Bogotá D.C., Colombia

2017

"En tiempos de cambio, quienes están abiertos al aprendizaje se adueñarán del futuro, mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe".

Eric Hoffer

Agradecimientos

A mi familia, mis padres y mis hermanos, quienes me han acompañado desde el inicio de mi carrera académica, especialmente en mi proyecto de convertirme en Odontóloga y ahora Especialista en Periodoncia, porque con su apoyo, confianza y ayuda he podido cumplir mis metas y sueños, y he completado este reto tan importante en mi vida.

A la Universidad Nacional de Colombia y a sus directivas, quienes me ofrecieron el marco académico con lo que pude aprender y desempeñar mis labores profesionales como lo he hecho hasta el día de hoy.

A la Dra. Lina Suarez directora del posgrado y directora del proyecto, quien fue la guía y el apoyo durante todo mi trayecto por el posgrado de Periodoncia y tuvo la paciencia durante la creación de este trabajo de grado

A mis profesores, quienes me dieron el conocimiento y las herramientas con las que completé exitosamente este ciclo que continuara enriqueciéndose como ellos me enseñaron.

A la Dra. Nelly Roa co-directora del proyecto y directora del centro de investigaciones odontológicas (CIO) de la Universidad Javeriana, por su apoyo y guía durante el desarrollo de este trabajo.

A Stephanie Quiñones y Mayra Téllez bacteriólogas del CIO, quien siempre tuvieron la disposición, tiempo y paciencia para colaborar con el procesamiento de las muestras.

Y Finalmente, agradezco a mis amigos y compañeros de posgrado con quienes compartí esta experiencia y con los que trabajé de cerca para lograr llegar hasta este punto. Su compañía en los buenos y malos momentos, y en los grandes y pequeños retos fue una contribución invaluable a esta experiencia.

Resumen

Objetivo: Establecer las variaciones en las subpoblaciones de linfocitos Th17 ("reguladoras" (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁺) y las "efectoras" (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻), en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal agresiva

Materiales y métodos: Se tomo una muestra de sangre periférica de 6 pacientes sistémicamente sanos, 3 periodontal mente sanos y 3 con diagnóstico de periodontitis agresiva, se realizaron marcaciones con anticuerpos Anti-CD3, Anti-CD4, Anti-CD161 y Anti CD25, las muestras fueron pasadas por citometría de flujo y los resultados se analizaron con el Test de Mann Whitney.

Resultados: Se encontraron niveles aumentados, de células Th17 (CD4⁺, CD161⁺), así como porcentajes mayores de subpoblaciones Th17 reguladoras (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁺), En pacientes con periodontitis agresiva en comparación con los controles sanos. Mientras que para la subpoblación efectora (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻), los niveles fueron estables para los dos grupos. Los resultados no fueron estadísticamente significantes (P= 0.4 , 0.7 y 1.00 respectivamente).

Conclusiones: Aunque los resultados no son significativos se halló, que el posible rol de las células Th17 en la periodontitis agresiva, es regulador y no patológico. Se necesita un tamaño de muestra más grande para confirmar dichos resultados

Palabras clave: Periodontitis agresiva, respuesta inmune, células TH17, poblaciones Th17, plasticidad células T .

Abstract

Objective: Establishing the variations in lymphocyte subpopulations Th17 ("regulators" (CD4+, CD161+, CD25+) and the "effectors" (CD4+, CD161+, CD25-) in peripheral blood, from systematically healthy patients with or without aggressive periodontal disease.

Materials and methods: A peripheral blood sample was taken from six (6) systematically healthy patients: Three (3) periodontally healthy patients, and three (3) diagnosed with aggressive periodontitis. Later, antibodies Anti-CD3, Anti-CD4, Anti-CD161, and Anti CD25 were added to the blood samples. Finally, the samples underwent Flow Cytometry, and the results obtained were analyzed using the Mann Whitney Test.

Results: The laboratory findings showed increased levels of Th17 (CD4+, CD161+) cells, and higher percentages of regulator subpopulation Th17 (CD4+, CD161+, CD25+) in patients with aggressive periodontitis than in patients from the control group. On the other hand, the effector subpopulation (CD4+, CD161+, CD25) showed stable levels for both groups. However, these results are non-statistically significant ($P= 0.4$, 0.7 y 1.00 respectively).

Conclusions: Even though the results are non-statistically significant, there is prove that the role of Th17 cells in aggressive periodontitis is regulatory and not pathological. Also, it is necessary to use a larger sample to confirm those results.

Keywords: Aggressive periodontitis, immune response, T helper type 17, T cell plasticity, Th17 populations

Contenido

1. Introducción	4
2. Marco Teórico.....	8
2.1 Generalidades de la enfermedad periodontal	8
2.2 Periodontitis agresiva	10
2.3 Respuesta inmune en periodontitis agresiva.....	11
2.4 Epidemiología.....	13
2.5 Linfocitos Th17	14
2.6 Plasticidad Linfocitos Th17 y Treg.....	16
2.7 Células Th17 y Treg en autoinmunidad.....	18
2.8 Células Th17 en enfermedad periodontal	21
3. Materiales y métodos.....	24
3.1 Muestra	24
3.2 Análisis de Resultados	27
4. Resultados.....	28
4.1 Características de la población	28
4.2 Análisis de resultados	31
5. Discusión	37
6. Conclusiones y recomendaciones	41
6.1 Conclusiones.....	41
6.2 Recomendaciones.....	41
7. Anexos	42
7.1 Anexo 1: Consentimiento Informado	42

7.2	Anexo 1: Historia Clínica	45
7.3	Anexo 2: Cuestionario (HAQ)	50
8.	Bibliografía	53

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 4.2-1 Figura representativa de las células CD4+CD161+.por citometría de flujo	30
Figura 4.2.-2 Test de Mann Whitney Análisis comparativo de la expresión de células T CD4 ⁺ CD161 ⁺	31
Figura 4.2-3. Representación de la adquisición de células CD4+CD25+CD161+ Y CD4+CD25-CD161+.....	33
Figura 4.2-4 Test de Mann Whitney Análisis comparativo de la expresión de células T CD4 ⁺ CD161 ⁺ CD25 ⁺	33
Figura 4.2-5 Test de Mann Whitney Análisis comparativo de la expresión de células T CD4 ⁺ CD161 ⁺ CD25 ⁻	34

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 4.1-1: Análisis demográfico	26
Tabla 4.1-2: Resumen de antecedentes personales reportados	26
Tabla 4.1-3: Resumen antecedentes familiares según ocurrencia	27
Tabla 4.1-4: Resumen antecedentes personales específicos.	28
Tabla 4.1-5: Valores promedio de las mediciones clínicas periodontales por grupo de pacientes.	29
Tabla 4.2.1 Porcentaje poblaciones celulares	30

1.Introducción

La enfermedad periodontal es la consecuencia de una respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales, la cual es suscitada por los microorganismos presentes en la placa dental. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad dependen de la naturaleza de la respuesta del huésped, la cual está dada por la susceptibilidad del mismo. La periodontitis crónica puede mantenerse estable por años, presentando una progresión lenta, que puede llevar a la pérdida dental¹.

La respuesta inmunológica inicial en la periodontitis crónica ocurre después de la colonización de bacterias periodontopatógenas en el surco gingival. La presencia de estas bacterias resulta en la expresión de citoquinas y quimioquinas por parte del epitelio gingival, lo que lleva a la expresión de moléculas de adhesión, incremento de la permeabilidad de los capilares gingivales y a la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares a través del epitelio de unión. Las citoquinas y quimioquinas específicas producidas en esta respuesta inicial, llevan a un infiltrado inflamatorio con dominancia perivascular de células T y macrófagos en el tejido conectivo. Si esta respuesta celular no controla el desafío bacteriano, se realiza una progresión de la lesión hacia células B. La subsecuente producción de anticuerpos puede controlar la infección o por el contrario puede resultar en la destrucción de tejido conectivo y del tejido óseo. La efectividad de esta respuesta varía en cada individuo y parece estar determinada por la susceptibilidad del mismo ¹.

La periodontitis agresiva por su parte, sigue un aparente curso clínico diferente al no estar precedida por gingivitis, lo que sugiere que este tipo de enfermedad presenta una secuencia de iniciación, y de progresión que difiere a la periodontitis crónica y por tanto una respuesta inmune posiblemente diferente¹. Esta patología se caracteriza por: ser de rápida progresión, donde los depósitos bacterianos no son consistentes con la severidad de la enfermedad y va a conllevar pérdida prematura de dientes y presentar agregación familiar. Aparte de esta enfermedad el paciente se encuentra sistémicamente sano ^{2,3}.

¹ Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:111–23

² Ay ZY, Yılmaz G, Özdem M, Kocxak H, Sütçü R, Uskun E, et al. The Gingival Crevicular Fluid Levels of Interleukin-11 and Interleukin-17 in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2012;1425–31

³ Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;(24):1–6.

Los linfocitos T ayudadores constituyen un arma importante en la respuesta del sistema inmune, debido a que coordinan la defensa contra microorganismos específicos, estos una vez activados sufren una polarización y se diferencian en diferentes subpoblaciones (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Tregs (CD4+CD25+), las cuales van a producir citoquinas con diferentes funciones efectoras que median la respuesta del huésped contra la infección^{4,5}.

Las células Th17 por su parte, promueven la eliminación de ciertos patógenos extracelulares y pueden mediar la respuesta inflamatoria; se caracterizan por la producción de IL-17 e IL-22, la primera asociada al reclutamiento y modulación de la homeostasis de neutrófilos, siendo esta descrita como una de las funciones efectoras más importantes y la segunda asociada al mantenimiento de la integridad epitelial, estimulando reacciones reparativas⁴. Sin embargo se ha encontrado que las células Th17 presentan plasticidad que les permite cambiar su fenotipo y por tanto su función⁶. Las Th17 se subdividen en diferentes subpoblaciones de Th17, que incluyen la Th17 effector (Teff17), Th1 like y Th17 treg (Treg17), las segundas con la capacidad de producir IFN- γ y las terceras capaces de producir IL-10, cumpliendo esta última, funciones regulatorias y por tanto generando un nuevo paradigma en cuanto a su participación en enfermedades inflamatorias^{6,7,8}.

Los linfocitos Th17, expresan en su superficie un receptor para IL-23 (IL-23R) y el factor de transcripción específico RORC y por ello se consideran como un linaje diferente de células CD4+⁹. Comparten varios marcadores con otros subtipos de células CD4+, pero se distinguen dos poblaciones de células Th17 con marcadores distintivos CCR6+CCR4+ o CCR2+CCR5- demostrando que esta es una población heterogénea. Expresan además el receptor de lectina CD161, conocido también

⁴ Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature*. 2008;453:1051–1057.

⁵ Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016;1–9

⁶ Kleiweietfeld M., Hafler D. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25:305–12.

⁷ Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J Med Res*. 2013;138(5):591–584

⁸ Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front Immunol*. 2014;5:1–13.

⁹ Maddur MS, Miossec P, Kaveri S V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. 181(1):8–18.

como KLRB1 (Killer cell lectin-like receptor B1), marcador importante en la proliferación de células T⁷.

Se ha encontrado que las citoquinas del linaje de las células Th17 juegan un rol importante en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, psoriasis, entre otras. Por tanto se ha planteado que en periodontitis agresiva pueden tener un rol importante y proveer un modelo interesante en la examinación del papel de las células Th17 en esta enfermedad^{10,11}. Así como también se plantea la existencia de un aumento de dichas células a nivel de sangre periférica lo que sugeriría una relación entre enfermedades infecciosas de cavidad oral y la patogénesis de enfermedades en otros sistemas del cuerpo humano

Ya se ha encontrado en periodontitis crónica, un aumento de las células Th17 en pacientes sistémicamente sanos^{3,12,13}; incluso en un estudio previo realizado en la facultad de Odontología de la Universidad Nacional, se halló un aumento significativo de estas células en sangre periférica de pacientes con este diagnóstico¹⁴.

En periodontitis agresiva no se encuentran muchos estudios que hallen una relación con las células Th17, aunque se ha visto un aumento de IL-17 en sangre periférica de dichos pacientes², sin embargo aún no se encuentran estudios que relacionen o cuantifiquen las subpoblación de Th17 en esta enfermedad.

³ Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;(24):1–6.

⁷ Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J Med Res*. 2013;138(5):591–584

¹⁰ Schenkein H, Koertge T, Brooks C, Sabatini R, Purkall D, Tew J. IL-17 in Sera from Patients with Aggressive Periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(9):943–7.

¹¹ Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect*. 2009;11:625–30.

¹² Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32:383–9

¹³ Cheng W, Hughes F, Taams L. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41:541–9.

¹⁴ Suárez L, Roa N, Vargas D. Expresión de Linfocitos T CD4+ Th17 en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con Periodontitis Crónica. *Univ Nac Colomb Fac Ododnología*. 2014

² Ay ZY, Yilmaz G, Özdem M, Kocxak H, Sütçü R, Uskun E, et al. The Gingival Crevicular Fluid Levels of Interleukin-11 and Interleukin-17 in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2012;1425–31

Es por esto que el objetivo del estudio es establecer las variaciones en las subpoblaciones de linfocitos Th17 a través de la tinción celular con anticuerpos mononucleares en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos, con y sin enfermedad periodontal agresiva.

2.Marco Teórico

2.1 Generalidades de la enfermedad periodontal

El periodonto es el conjunto de tejidos que constituyen el órgano de sostén y protección, su función principal consiste en unir el diente, al tejido óseo de los maxilares y en mantener la integridad en la superficie de la mucosa masticatoria, constituye una unidad de biológico y funcional que experimenta cambios con la edad, y está sometida a cambios morfológicos relacionadas con alteraciones funcionales y del medioambiente; comprende la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar¹⁵.

De acuerdo a su función se divide en¹⁵:

- Periodonto de Protección: que comprende la encía y la unión dentogingival estos se encargan de aislar la porción coronaria expuesta y protege las estructuras de sostén
- Periodonto de inserción: comprende el cemento radicular el ligamento periodontal y el hueso alveolar

Las estructuras de un tejido gingival normal y las alteraciones del tejido conectivo ocurren durante el desarrollo de la periodontitis y han sido altamente descritas¹⁶. A nivel histopatológico Page y Shorroeder proponen el siguiente modelo:

Una lesión inicial aparece dentro de los 4 primeros días de acumulación de placa bacteriana, no es clínicamente visible y se caracteriza por una respuesta inflamatoria aguda a la acumulación de placa. La lesión inicial es localizada a la región del surco gingival, y los tejidos afectados incluyen la porción del epitelio de unión y la parte más coronal del tejido conectivo. Se produce una dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas del plejo dento-gingival, así como un incremento de la permeabilidad microvascular, lo cual es evidente histopatológicamente. La principal característica consiste en un incremento del flujo crevicular y la migración

¹⁵ Lang NP, Lindhe J. Clinical Periodontology and Implan Dentistry. Sixth Edit. Wiley Blackwell; 2015.

¹⁶ Page RC, Schroeder HE. Current Status of the Host Response in Chronic Marginal Periodontitis. J Periodontol. 1981;52(9):477-91.

de neutrófilos del plejo vascular abajo del epitelio de unión y surcular; la pérdida de colágeno es localizada en el área de infiltrado inflamatorio¹⁷.

Después de aproximadamente 7 días de acumulación de placa, un infiltrado inflamatorio de leucocitos mononucleares se desarrolla en el sitio de la lesión inicial donde progresa a la lesión temprana. Los vasos debajo del epitelio de unión permanecen dilatados, pero el número aumenta debido a la apertura de camas capilares previamente inactivas. Los linfocitos y macrófagos predominan en la periferia de la lesión con la presencia de unas pocas células plasmáticas. En esta etapa, el infiltrado ocupa alrededor del 15% del tejido conectivo gingival, con destrucción de colágeno en el área de infiltrado que alcanza el 60-70%. Las células del infiltrado toman espacio creado por la destrucción del colágeno. Clínicamente, los cambios inflamatorios son visibles hay presencia de edema y eritema¹⁶.

Después de 2 a 3 semanas de acumulación de placa, la lesión temprana evoluciona a una lesión establecida. Clínicamente se observará una lesión más edematizada y podría establecerse como una gingivitis establecida, la cual se caracteriza por un aumento del área afectada y el predominio de células plasmáticas y linfocitos en la periferia de la lesión; Los macrófagos y los linfocitos son detectables en la lámina propia de la bolsa gingival. Hay presencia prominente de neutrófilos en el epitelio de unión y del surco. El epitelio de unión y del surco puede proliferar y migrar más profundamente en el tejido conectivo. El surco gingival se profundiza y la porción coronal del epitelio de unión se convierte en bolsa epitelial. La bolsa epitelial no está unida a la superficie del diente y tiene un pesado infiltrado de leucocitos, predominantemente neutrófilos, que eventualmente migraran a través del epitelio a la bolsa periodontal¹⁷.

Las características de la lesión avanzada incluyen la formación de bolsas periodontales, ulceración de la superficie y supuración, destrucción del hueso alveolar y del ligamento periodontal, movilidad dental y eventualmente pérdida del mismo. La lesión avanzada se caracteriza por las mismas características presentes en la lesión gingival establecida, pero es acompañada por la destrucción de la unión del tejido conectivo a la superficie radicular y la migración de la unión epitelial. La progresión de la gingivitis a la periodontitis está marcada por el cambio en la predominancia de células T a células B. La destrucción del hueso alveolar comienza a lo largo de la cresta ósea interdental. El epitelio prolifera apicalmente a lo largo de

¹⁷ Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8–20.

la superficie radicular. Esto lleva a la extensión de proyecciones en forma de dedo del epitelio de la bolsa dentro del tejido conectivo profundo: Las proyecciones son irregulares como crestas con una capa basal discontinua y no están unidas al diente¹⁵.

2.2 Periodontitis agresiva

Según el consenso de la Academia Americana de Periodoncia de 1999 establecen que la periodontitis agresiva es un tipo de periodontitis específica que puede ser claramente identificada clínicamente, donde los resultados de laboratorio la hacen suficientemente diferente de la periodontitis crónica. Se puede clasificar en localizada y generalizada, y comparten características comunes como¹⁸:

- Excepto por la presencia de periodontitis, los pacientes son sanos sistémicamente.
- Pérdida de inserción y destrucción ósea rápida
- Agregación familiar

Otras Características presentes que son generales, pero no universales son¹⁸:

- Cantidad de depósitos microbianos inconsistentes con la severidad de la destrucción periodontal.
- Elevadas proporciones de *Actinomyces actinomycetemcomitans* y en algunas poblaciones puede estar elevadas la *Porphyromonas gingivalis*.
- Anormalidades en la fagocitosis.
- Hiper-respuesta del fenotipo macrófago, incluyendo elevados niveles de PGE₂ e IL-1β.
- La progresión de la pérdida de inserción y de la pérdida ósea puede ser autodestructiva.
-

¹⁵ Lang NP, Lindhe J. Clinical Periodontology and Implan Dentistry. Sixth Edit. Wiley Blackwell; 2015.

¹⁸ Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. Ann od Periodontol. 1999;4(1):53.

El Workshop Internacional de Clasificación identificó características clínicas y de laboratorio consideradas lo suficientemente específicas para permitir una subclasificación de las formas de periodontitis agresiva en localizada y generalizada. Se identificaron las siguientes características¹⁸:

- Periodontitis agresiva localizada (LAP)^{15,18}:
 - Inicio en etapa Circumpubertal
 - Presentación localizada en primer molar/incisivo con pérdida de inserción interproximal en al menos dos dientes permanentes, uno de los cuales es un primer molar, e involucrando no más de dos dientes que no sean primeros molares e incisivos
 - Respuesta fuerte de anticuerpos en suero a agentes infecciosos.
- Periodontitis agresiva generalizada (GAP)^{15,18} :
 - Generalmente afecta a personas menores de 30 años, pero los pacientes pueden ser mayores.
 - Pérdida de inserción interproximal generalizada que afecta al menos a tres dientes permanentes diferentes a primeros molares e incisivos
 - Naturaleza episódica pronunciada de la destrucción ósea y pérdida de inserción.
 - Respuesta pobre de anticuerpos en suero a agentes infecciosos.

2.3 Respuesta inmune en periodontitis agresiva

Clásicamente y como se ha descrito la primera línea de defensa del huésped proviene de la inmunidad innata, en la forma de neutrófilos y macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y dendríticas, las cuales están normalmente y constantemente comprometidas en la respuesta a las bacterias provenientes de la placa dental, cuando el estímulo bacteriano continua y la respuesta del huésped no logra controlar el desafío bacteriano, complejas cascadas inflamatorias son activadas, y se lleva a cabo una respuesta inmunitaria adaptativa, y donde la lesión progresa de una respuesta con predominio de células T a una respuesta con predominio de células. En periodontitis agresiva estas respuestas se han visto

alteradas¹⁹. La evidencia ha mostrado una alteración de la respuesta inflamatoria desde sus inicios, se ha observado varias anormalidades asociadas a la respuesta de los neutrófilos, se ha encontrado una hiperfuncionalidad de estos, que los hace capaces de amplificar la destrucción del tejido periodontal, se demaistrado además una disfunción en la quimiotaxis dada por un decremento de los niveles de calcio intracelular, que como consecuencia va a disminuir la actividad de la protein-kinasa C dependiente de calcio (PKC) en los neutrofilos, entre otras anormalidades como: un pronuncioado decremento en la actividad de diacilglicerol (DAG) kinasa, asi como producción de lipoxina LX₄, la cual se relaciona con los hallazgos de prostaglandina E₂ en fluido crevicular de estos pacientes, estas alteraciones se ven directamente implicadas en la agresividad de la patogénesis de la enfermedad²⁰.

De igual forma se ha reportado en pacientes con periodontitis agresiva un fenotipo de macrófago hiper-reactivo, donde se encontraban altos niveles de protaglandina E₂ y de IL-1 β , de echo algunos estudio sugieren que la proteína específica de macrofagos MIP-1 α podria llegar a ser un marcador específico de riesgo para periodontitis agresiva²¹.

En cuanto al nivel de anticuerpos la litaratura a reportado un aumento en IgG en pacientes con periodontitis agresiva en comparación a pacientes con periodontitis crónica, asi mismo se reporta que este aumento no es dependiente del tipo de microorganismo presente²².

Por otro lado se ha establecido que en pacientes con lesión establecida de periodontitis crónica hay predominancia de células B, pero en periodontitis agresiva la evidencia es limitada y controversial; se ha encontrado disminución de los niveles de CD3⁺ que puede estar dada por la menor presencia de células CD4⁺, además se ha visto que tanto en pacientes sanos o con gingivitis versus pacientes con

¹⁹ Nibali L. Aggressive Periodontitis: microbes and host response, who to blame? *Virulence*. 2015;6(3):223–8

²⁰ Kantarci A, Oyaizu K, Dyke TE Van. Neutrophil-Mediated Tissue Injury in Periodontal Disease Pathogenesis: Findings from Localized Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2003;74:66–75

²¹ Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godbole D, et al. Macrophage Inflammatory Protein-1 α Shows Predictive Value as a Risk Marker for Subjects and Sites Vulnerable to Bone Loss in a Longitudinal Model of Aggressive Periodontitis. *PLoS One*. 2014;9(6):1–11

²² Hwang AM, Stoupel J, Celenti R, Demmer RT, Papapanou PN. Serum Atibody Responses to Periodontal Microbiota in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Postulate Revisited. *J Periodontol*. 2014;85(4):592–600

periodontitis agresiva los niveles de CD8⁺ son estables, indicando que estas pueden no estar jugando un rol importante en la patogénesis de la enfermedad²³.

En cuanto a los perfiles de Th1 y Th2 no se han encontrado grandes diferencias entre los grupos de periodontitis crónica y agresiva, se ha visto una tendencia a niveles más bajos de Th2 en pacientes con periodontitis agresiva por lo que esta puede estar jugando un rol en la patogenesis de la enfermedad²⁴.

Esta alteración en el balance de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, puede verse representado en el aumento en el radio de IL-1 β en periodontitis agresiva generalizada en comparación con pacientes sanos²⁵. Se ha encontrado en fluido crevicular y en plasma de estos pacientes niveles más bajos de IFN- γ , así como también menores proporciones de Treg, lo que concuerda con el hallazgo en algunos estudios en la ausencia de la expresión de IL-10 y niveles mas bajos de citoquinas antiinflamatorias IL-13 e IL-1ra, esta alteración en la producción de citoquinas puede estar involucrada en el impacto de la respuesta inmune de estos pacientes^{23, 24}.

2.4 Epidemiologia

En dentición permanente en individuos de 13-20 años los estudios reportan una prevalencia de periodontitis agresiva de <1% (en población caucásica de 0.1-0.2%). Sin embargo, esto puede llegar a variar en las diferentes poblaciones, es así como en raza negra se reporta prevalencias de hasta 2.6%¹⁵.

En Suramérica se han reportado numerosos estudios; en Brasil Gjermo y colaboradores (1984) reportaron en adolescentes de 15 años una prevalencia de 2.6%, mientras Albandar y col. (1987) en su estudio con niños de 13 años una prevalencia de 1.3%, Mientras Tinoco y col (1995) examinaron adolescentes entre

²³ Suarez. LJ, Ocampo AM, Dueñas RE, Rodríguez A. Relative Proportions of T-Cell Subpopulations and Cytokines That Mediate and Regulate the Adaptive Immune Response in Patients with Aggressive Periodontitis. J Periodontol. 2004;75(9):1209–15

²⁴ Elabdeen HRZ, Mustafa M, Ali R, Bolstad AI. Cytokine profile in gingival crevicular fluid and plasma of patients with aggressive periodontitis. Acta Odontol Scand. 2017;1–6.

²⁵ Teles1 RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles1 FRF, Feres M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2010;37:313–23

los 12 y 19 años y obtuvieron una prevalencia de 0.32%. En Chile López y col (1991) reportaron en adolescentes de 15 a 19 años una prevalencia de 0.32%²⁶.

En Colombia son pocos los estudios de prevalencia de periodontitis agresiva, en el ENSAB IV basados en los Criterios diagnósticos del Grupo de Seguimiento de la Enfermedad Periodontal Academia Americana de Periodoncia (AAP) y Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) -AAP/CDC- (Page y Eke, 2007). Los cuales denominan como periodontitis leve o incipiente si hay pérdida de inserción mayor o igual a 3 mm en 2 sitios interproximales o más, o 1 diente con profundidad de sondaje mayor o igual a 5 mm en sitios interproximales; periodontitis moderada, si hay pérdida de inserción mayor o igual a 4 mm en 2 sitios interproximales o más, o 2 dientes con profundidad de sondaje mayor o igual a 5 mm en sitios interproximales; y, como periodontitis severa cuando hay pérdida de inserción mayor o igual a 6 mm en 2 sitios interproximales o más, o 1 diente con profundidad de sondaje mayor o igual a 5 mm en sitios interproximales²⁷.

Como resultado del ENSAB IV reportan la presencia de periodontitis a los 18 años con una prevalencia de 21.90%, distribuida en las categorías leve (10.69%) y moderada (10.97%). De estos el 81.48% presentaban una severidad en la pérdida de inserción leve (1- 2.9mm) y el 0.54 % presentaban una pérdida moderada y severa (>3mm)¹⁸. Sin embargo, dado los criterios de evaluación, estos no diferencian entre una periodontitis crónica o agresiva.

2.5 Linfocitos Th17

Las células CD4⁺ vírgenes en respuesta a citoquinas presentes durante el proceso inflamatorio sufren una polarización. Las Th1, inducidas por el factor de transcripción T-bet, produce interferón- γ (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2) y linfotoxina, y son cruciales para la eliminación de patógenos intracelulares¹⁸. En contraste las

¹⁵ Lang NP, Lindhe J. Clinical Periodontology and Implan Dentistry. Sixth Edit. Wiley Blackwell; 2015.

²⁶ Albandar JM, Tinoco EMB. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. Periodontol 2000. 2002;29:153–76

²⁷ Ministerio de Salud y Protección Social. IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB - IV 2013-2014. Ministerio Salud y Prot Soc. 2015;

células Th2 son generadas por el factor de transcripción GATA-3, producen IL-4, IL-5 e IL-13, y orquestan la eliminación de patógenos extracelulares^{4,28}.

Después del descubrimiento de las Th1 y Th2 se realizaron adiciones a las subpoblaciones de células Th, una de estas fueron las células reguladoras FOXP3⁺ (Treg) y las células Th17. La mejor característica de la población de células T naturalmente regulatorias (Treg o nTreg) es que pueden ser identificadas por la alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25). Estas a su vez células Treg son distintas del linaje CD4⁺, se generan durante el desarrollo tímico, y juegan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica⁵. Mientras las Th17 producen IL-22, IL-17A, IL-17F que promueven la eliminación de ciertos patógenos extracelulares y pueden mediar la respuesta inflamatoria⁴.

Las células Th17 provienen de la polarización de células T CD4⁺ vírgenes las cuales en respuesta a citoquinas presentes en las primeras fases de la respuesta inmunitaria y debido a la presencia de un antígeno específico, se da a la activación de la transcripción y modificaciones epigenéticas que genera la diferenciación en diferentes subpoblaciones con diferentes funciones efectoras⁴.

Para la diferenciación a Th17 se requiere de 3 pasos: inducción, amplificación y estabilización o mantenimiento. La iniciación comienza con la presencia de IL-1, IL-6 e TGF- β , estos activan los factores de transcripción STAT3 y ROR- γ t que estimulan la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes en células Th17, la amplificación está dada por la IL-21 producida por estas, que actúa como feedback positivo. La IL-23 producida también por las Th17 promueve el mantenimiento y la

⁴ Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature*. 2008;453:1051–1057.

¹⁸ Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann od Periodontol*. 1999;4(1):53.

²⁸ Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012;13(991–1001).

estabilización de las mismas para producir sus citoquinas efectoras la IL-17A, IL-17F y la IL-22^{4,29,30}.

La IL-17A y la IL-17F son interleucinas de la familia IL-17 (constituida por seis miembros A, B, C, D, E, F) las cuales tienen funciones similares inducen citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) y quimioquinas (CXCL1, GCP-2, CXCL8 o IL-8, CINC, MCP-1). Estas incrementan la producción de prostaglandina E2, óxido nítrico y matriz metaloproteinasas, incrementan el reclutamiento de neutrófilos, así como regulan la homeostasis de los mismos⁴.

La IL-22 es miembro de la familia de las citoquinas de la IL-10, producida por células T activadas y células NK, incrementa la función protectora de los hepatocitos ante inflamación aguda del hígado, induce la expresión de β defensinas en células epiteliales, manteniendo la integridad epitelial y estimulando reacciones reparativas, así mismo se ha visto que altas concentraciones TGF- β inhibe la expresión de IL-22 por parte de la IL-6, se ha sugerido que la IL-22 puede representar el punto final de la producción de citoquinas efectoras por células Th17 terminalmente diferenciadas⁴.

En cuanto a los marcadores de superficie celulares las Th17 se ha encontrado que expresan altamente el receptor de quimiocinas CCR6, así como también expresan CD161, altos niveles de CD49d y la cadena α de la integrina VLA-4⁶.

2.6 Plasticidad Linfocitos Th17 y Treg

Aunque se pensaba que las células Th17 eran patogénicas se han acumulado datos que han demostrado la existencia de células Th17 no patogénicas productoras IL17⁸.

Se evidencio a su vez que la polarización de las células CD4⁺ basado en el paradigma Th1/Th2 no era un proceso estable para algunas subpoblaciones de Th.

⁴ Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature*. 2008;453:1051–1057.

⁶ Kleinewietfeld M., Hafler D. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25:305–12.

²⁹ Cosmi L, De Palma R, Sallusto F, Santarlasci V, Maggi E, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17 –producing cells originate from a CD161 + CD4 +T cell precursor. *J Exp Med*. 2008;205(8):1903–16.

³⁰ Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014;1–10.

Bajo ciertas circunstancias las células Th diferenciadas Th17 y Treg muestran una gran magnitud de plasticidad y son capaces de cambiar su fenotipo y su función⁶.

Se encontró que las células Th17 además de la diferenciación convencional que presentaba a partir del TGF- β con IL-23 e IL-6 (Th17 efectoras (Teff17) patológicas)⁸, podían presentar el potencial de secretar IFN- γ y en ratones y en humanos, estas se identificaron como la población Th1-like, se encontró que la estabilidad de las Th17 era dependiente de TGF- β y se pierde en presencia de IL-12, favoreciendo la expresión de IFN- γ y dependiente de Tbet y STAT4. Esta flexibilidad de las Th17 está dada por el estado epigenético de estas, y podían ser diferenciadas de las células Th1 por la expresión de CD161. Esta observación fue reafirmada por la alta frecuencia de co-expresión de IFN- γ e IL-17. La plasticidad de las Th17 a un fenotipo tipo Th1 es altamente dependiente del microambiente de citoquinas, la situación inflamatoria y la patogenicidad de las mismas⁶.

Una inducción celular diferencial similar de Th17 en un fenotipo patogénico o antiinflamatorio fue descrito en humanos utilizando diferentes estímulos antigénicos, se indujo a las Th17 a producir la citoquina antiinflamatoria IL-10. Se sugirió que este proceso podía servir como mecanismo de control a una inflamación excesiva⁵.

Por último, se ha descrito una plasticidad análoga a Th17/Th1, indicando que las células Th17 pueden adquirir también un fenotipo tipo Th2 y jugar un rol potencial en el asma, se demostró *in vivo* la conversión de células Th17 en tipo celulares Th2 expresoras de IL-4. Sin embargo, esta información necesita de más investigación, ya que aún no se tiene claro el mecanismo de esta⁶.

En cuanto a los marcadores de superficie, de acuerdo con la expresión de CD25, CD4⁺, CD161⁺, las células T pueden dividirse en subpoblaciones “reguladoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁺) y en “efectoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻). En estudios recientes de artritis inflamatoria se identificó que la subpoblación (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁺) eran células T productoras de IL-17 del tipo Th17-like Treg, las cuales mostraron un detrimento de la actividad supresora y podía contribuir a la autoinmunidad en los sitios de la inflamación. Las células efectoras CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻ no poseen la función supresora, siendo estas patogénicas en condiciones de autoinmunidad a través de la producción de IL-17³¹.

⁶ Kleinewietfeld M., Hafler D. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2013;25:305–12.

2.7 Células Th17 y Treg en autoinmunidad

El desarrollo de vías de Th17 y Treg son recíprocamente reguladas y pueden influenciar los resultados de la respuesta inmune, particularmente en enfermedades autoinmunes.

Algunas mutaciones génicas llevan a la alteración de la función de las células Th17 y la producción de IL-17, como sucede en el síndrome autosómico dominante Hiper IgE (HIES síndrome de Job), se asocia con alto niveles de IgE, tiene manifestaciones en piel y pulmones, así como tiene afectación en huesos y aumento de infección, se caracteriza por la mutación en el gen STAT3 el cual lleva a la ausencia de producción de IL-17 en células T y por consiguiente se puede observar graves infecciones bacterianas y fúngicas, a su vez las vías de Th17 alteran las vías de Th2 y por consiguiente la producción de IgE. (IL17 y TH17) Otras mutaciones como la que se genera en pacientes con candidiasis mucocutánea donde se ve alterado el STAT1, el cual bloquea la generación efectiva de Th17 y por tanto en estos pacientes se puede observar que sufren de severas infecciones por candida en piel, uñas y membranas mucosas⁹.

En enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, la cual es una enfermedad inflamatoria crónica que lleva a inflamación cerebral y que involucra un rompimiento de la tolerancia, las células Th17 son consideradas importante en la patogénesis de la misma. Se ha descrito una sobreexpresión de IL-17⁹ en biopsias de cerebros de pacientes con esta enfermedad, así como se reporta un desbalance en el desarrollo y función de las subpoblaciones de Treg, la alteración de estas ha sido asociada con el estado de discapacidad en pacientes con recaídas, por tanto, se cree que en la patogénesis de la esclerosis múltiple el balance de Th17 y Treg es crítico y crucial³⁰.

Otra enfermedad en la que se ha visto la importancia de estas células Th17 es en la artritis reumatoidea, la cual se caracteriza por ser una inflamación crónica de la membrana de la articulación sinovial, que lleva a la destrucción de la misma

⁸Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front Immunol.* 2014;5:1–13.

⁹ Maddur MS, Miossec P, Kaveri S V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol.* 181(1):8–18

³¹ Li L, He J, Zhu L, Yang Y, Jin Y, Jia R, et al. The Clinical Relevance of IL-17-Producing CD4+CD161+ Cell and Its Subpopulations in Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res.* 2015;1–15.

articulación y del hueso. El proceso inflamatorio crónico de esta enfermedad indica que la regulación inmune esta perturbada y puede ser causada por una respuesta inflamatoria excesiva junto con una deficiencia en el control de la respuesta autoinmune. Se ha descrito un aumento de las células Th17 al evaluarlas en la membrana y en el fluido sinovial, este aumento también ha sido visto en sangre periférica de dichos pacientes. Las células Th17 exacerban la fase inflamatoria de la artritis a través de la activación de varios tipos de células en las articulaciones inflamadas, tales como macrófagos, células dendríticas o sinoviocitos del tipo fibroblástico, mediante la producción de IL-17, la cual está involucrada en la inducción y mediación de la respuesta inflamatoria, promoviendo mediadores pro-inflamatorios, tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β y otros mediadores como metaloproteinasas que llevan a la destrucción del cartílago y del hueso. Esta observación da soporte al rol en la patogénesis de la artritis reumatoidea sobre todo en los estados iniciales ³⁰.

Pacientes con lupus sistémico eritematoso (LSE) exhiben un incremento en los niveles de IL-23, IL-21 e IL-17, como resultado del aumento de las células Th17. Estos cambios han sido asociados a una reducción de la población Treg y a un incremento de la población Th17/Th1. La asociación genética de LSE con polimorfismos que codifican las moléculas de Th17 o sus receptores han sido reportados. Adicionalmente variaciones genéticas en los factores de transcripción, que regulan negativamente la diferenciación de las células Th17 pueden predisponer la aparición de LSE. El bloqueo en modelos murinos de la vía de la IL-21 han mostrado mejoría en los síntomas de la enfermedad⁹.

Otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria de Bowel, donde la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa son las mayores formas inmunológicas de esta enfermedad, han mostrado un aumento de linfocitos Th1 y Th17. Se ha observado altos niveles en suero de IL-17^a, IL-17F e IL-21. Ratones con colitis mostraron un incremento en el número de células Th17 en los sitios de inflamación de la lámina propia del íleon y del colon. La IL-21 media la diferenciación de las células Th17 y aumentan la respuesta inflamatoria, mediante el reclutamiento de células T al intestino inflamado y a través de la estimulación de enzimas

⁹ Maddur MS, Miossec P, Kaveri S V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Hum Pathol*. 181(1):8–18

³⁰ Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014;1–10.

degradadoras de matriz de los fibroblastos del intestino. En contraste también se ha encontrado que otras citoquinas como la IL-22 cumplían una función protectora en la enfermedad inflamatoria de Bowel, manteniendo la integridad del epitelio, protegiendo la producción de mucina. Por tanto las células de Th17 tienen diferentes efectos en el curso de la patogénesis de la enfermedad, y el efecto de estas citoquinas depende relativamente del número de las mismas ⁹.

En alergias y asma la IL-17 media el reclutamiento de neutrófilos y puede activar las células del músculo liso de las vías respiratorias, induciendo mediadores proinflamatorios IL-23 y células Th17, así como también pueden realizar una regulación positiva de los eosinófilos a través de las células Th2 lo cuales generan inflamación de las vías inflamatorias. Recientes estudios han mostrados la plasticidad de las células Th17 en pacientes asmáticos donde se muestra la producción de células CCR6⁺, CD161⁺, CD4⁺, co-expresando IL-17A/IL-4. Se encontró que las células de memoria Th17 expresaban IL-4R y respondían a IL-4 que inducían la fosforilación de STAT6. Esto sugiere una interacción de las células Th2 y Th17, en donde en un ambiente rico en IL-4 creado por células Th2 pueden proveer una plasticidad en células Th17 y generar un fenotipo Th17/Th2 lo cual podría agravar aún más la enfermedad⁹

En el síndrome de Sjögren primario se determinaron los niveles en circulación y la importancia clínica de las subpoblaciones de Th17, las “reguladoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁺) y las “efectoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻). Se evidenció que las células T CD4⁺ CD161⁺ eran capaces de producir más IL-17 en comparación a su contraparte CD161⁻. Se observa también que la subpoblación reguladora T CD4⁺ CD161⁺ estaban aumentadas en pacientes con este síndrome cuando presentaban anomalías en las funciones de Treg. Los niveles circulantes de CD4⁺ CD161⁺ se asociaron positivamente a parámetros de actividad de la enfermedad y presencia de anticuerpos. Todo esto sugiere que la IL-17 producida por las células T CD4⁺ CD161⁺ desempeñan un rol importante en el desarrollo de la inflamación y activación de células B en el síndrome de Sjögren primario³¹.

⁹ Maddur MS, Miossec P, Kaveri S V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol.* 181(1):8–18.

2.8 Células Th17 en enfermedad periodontal

Es alta la evidencia que la mayor destrucción del tejido en la enfermedad periodontal resulta del reclutamiento celular del huésped a través de la activación de macrófagos, linfocitos, fibroblastos y otros tipos celulares. Se han realizado grandes esfuerzos para estudiar las citoquinas liberadas por las células del huésped cuando son expuestas a diferentes componentes de las bacterias periodontopatógenas y se ha demostrado que se sintetizan gran número de citoquinas pro-inflamatorias, lo que lleva a la inducción y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en el periodonto ².

La respuesta inmune en la enfermedad periodontal está gobernada por las Th1, Th2 y Th17. Las citoquinas provenientes de las Th1 como la IL-2 median la respuesta inmunitaria mediada por células, por el contrario, las citoquinas liberadas de la Th2 como la IL-4 suprimen la respuesta inmunitaria mediada por células e incrementan la respuesta humoral, mientras que las citoquinas liberadas por las Th17 pueden cumplir un rol destructor y protector¹.

En la lesión inicial/establecida hay un dominio de macrófagos y células T donde las Th1 son importantes en el desarrollo de la respuesta inmune, El Interferón-gamma producidas por estas limita la infección aumentando la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos. La persistencia de antígenos bacterianos conduce a una no resolución de la infección, lo que genera la progresión de la lesión, la cual se caracteriza por el cambio en la naturaleza del infiltrado inflamatorio, se incrementa el número de células B y células plasmáticas esto ocurre a través de la estimulación por la IL-4 producida por las Th2¹.

Las células Th17 aparecen para generar un paradigma en la regulación de la respuesta inmune en la enfermedad periodontal. Las células Th17 expresan genes e interluquinas asociadas a la inflamación crónica, las cuales llevan a la producción

² Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32:383–9.

³¹ Li L, He J, Zhu L, Yang Y, Jin Y, Jia R, et al. The Clinical Relevance of IL-17-Producing CD4+CD161+ Cell and Its Subpopulations in Primary Sjögren's Syndrome. J Immunol Res. 2015;1–15.

de metaloproteinasas y a la sobre regulación en la expresión RANKL en osteoblastos, resultando en la formación de osteoclastos y por tanto en la destrucción ósea. El desarrollo de células Th17 en presencia de IL-23 es un regulador negativo de la respuesta mediada por Th1 por lo tanto juega un rol importante en el progreso de la enfermedad. La IL-17 induce a los fibroblastos a la producción de pro-MMP-1 y MMP-3 generando aumento en la destrucción del tejido conectivo. En contraste debido a que se ha encontrado gran plasticidad de las células Th17 hacia un perfil Th1, Th2 o Treg, este último podría llegar a demostrar que las células Th17 están jugando un rol regulador tanto en periodontitis crónica como agresiva^{1, 3}

Estudios como el realizado por Cardoso y col (2009) han mostrado un aumento niveles incrementados de IL-17, TGF β , IL-1 β , IL-6 e IL-23 en tejido periodontal en pacientes con enfermedad periodontal crónica, estos también evidenciaron un aumento en la expresión de RANKL en comparación con los pacientes de control³. Vernal y col. (2005) evaluaron fluido crevicular en lesiones con enfermedad periodontal, encontrando un aumento de la IL-17¹². En el 2008 Tomuyuki y col. Compararon pacientes con periodontitis y gingivitis encontrando un aumento en la producción de IL-17 y IL-12 en pacientes con periodontitis³². Adibrad y col. (2012) evaluaron 30 pacientes con periodontitis crónica versus controles sanos y hallaron una sobreexpresión de IL-17A y RORC2 en lesiones periodontales³³.

En pacientes con periodontitis agresiva Schenkein y col. (2010) hallaron alto niveles de IL-17 en suero de pacientes con enfermedad en comparación con controles sanos¹⁰.

¹ Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:111–23.

³ Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;(24):1–6

¹⁰ Schenkein H, Koertge T, Brooks C, Sabatini R, Purkall D, Tew J. IL-17 in Sera from Patients with Aggressive Periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(9):943–7

³² Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta*. 2008;395:137–417.

³³ Adibrad M, Deyhimi P, Hakemi G, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2012;1–7. Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta*. 2008;395:137–41

No se encontraron estudios ni en periodontitis agresiva ni en periodontitis crónica que evaluaran los perfiles de Th17 por tanto no es claro el papel patológico o regulador de las mismas en la enfermedad periodontal.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestra

La escogencia de la muestra se realizó examinando pacientes del servicio de las clínicas del Colegio Odontológico Colombiano sede Chia, pacientes del servicio de la Facultad de Odontología de la Universidad Pontifica Javeriana, pacientes del Servicio de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia Sede- Bogotá, de las clínicas del posgrado de Periodoncia y pacientes sanos estudiantes de Especialidad en Periodoncia y en Endodoncia, que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes Mayores de 18 años
- Sistémicamente sanos.
- Con diagnostico confirmado de sano o con periodontitis agresiva generalizada/localizada según los criterios de la Academia Americana de Periodoncia.

Criterios de exclusión:

- Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.
- Pacientes con enfermedades sistémicas controladas ó sin control.
- Pacientes que hayan recibido terapia antibiótica, antiinflamatoria ó con corticoesteroides en un término de 6 meses previos a la consulta.
- Pacientes con factor reumatoideo positivo.
- Pacientes fumadores.

Primera Etapa:

Examen inicial: Previa firma del consentimiento informado (Anexo 1) Se realizó primero el diligenciamiento de la historia clínica, donde se recolecto información de: alertas médicas, datos personales, antecedentes médicos personales y familiares.(Anexo 2): Adicionalmente los pacientes llenaron el cuestionario HAQ para determinar manifestaciones clínicas de artritis reumatoide. (Anexo 3).

Posteriormente se realizó examen clínico y periodontal, este se registró en el periodontograma medidas de seis superficies, para poder establecer diagnóstico y de acuerdo a este se realizó la selección de pacientes

Segunda Etapa:

Selección de pacientes: Para la selección de pacientes con periodontitis agresiva se tuvo en cuenta los siguientes aspectos clínicos de acuerdo a la Academia Americana de Periodoncia, pronunciada pérdida ósea y de nivel de inserción proximal afectando más de tres dientes permanentes, aparte de los incisivos y primeros molares; esta pérdida ósea y de nivel de inserción sin aparente correlación con los niveles de placa bacteriana.

Tercera Etapa:

Toma de muestras: Se tomaron 4 tubos de 3ml de sangre periférica los cuales fueron tomados en el hospital San Ignacio.

Las muestras de cada paciente se dividieron en dos; las primeras 3 muestras fueron utilizadas para pruebas de laboratorio clínico donde se realizó análisis de factor reumatoideo, cuadro hemático, hemoglobina glicosilada y perfil lipídico; para verificar estado sistémico de cada paciente.

Cuarta Etapa:

Selección procesamiento final de las muestras por citometría de flujo. Para el procesamiento de las muestras se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo Anti-CD3 humano, de origen murino, acoplado a fluorocromo Complejo de Proteína Peridrina-Clorofila (PerCP) (BD Biosciences, San José, CA, USA).
- Anticuerpo Anti-CD4 humano, de origen murino, acoplado a fluorocromo Fluoresceína Isotiocianato (FITC) (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA).
- Anticuerpo Anti-CD161 humano, de origen murino, acoplado a fluorocromo Alofocianina (APC). (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- Anticuerpo Anti- CD25 humano, de origen murino, acoplado a fluorocromo ficoeritrina Cytron 7 (PECy-7) (BD Biosciences, San José, CA, USA).

Siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales que proveen los anticuerpos, se procedió a realizar el siguiente protocolo para procesamiento de muestras a analizar por citometría de flujo. Cada una de las muestras obtenidas se procesó de la siguiente manera:

1. En un tubo de citometría de flujo (para Citómetro BD-CANTO, Beckton Dickinson, San José, CA, USA) se dispensó un volumen de 70 μ L de sangre.
2. Se agregaron los anticuerpos de la siguiente forma:
 - a. Tubo inicial, sin anticuerpos.
 - b. Tubo con cada uno de los anticuerpos por separado para calibrar el citómetro.
3. A cada paciente se le asigna un tubo marcado al cuál se agregaron los siguientes volúmenes de anticuerpos: 20 μ L de PerCP-Anti-CD3; 20 μ L de FITC-Anti-CD4; 20 μ L de APC-Anti-CD161, 5 μ L de Anti CD25 PECy7.
4. Se incubó durante 15 minutos, a una temperatura de 4°C, en condición de oscuridad.
5. Se adicionó a cada tubo 2mL de Buffer de Lisis 1X preparado previamente de la siguiente manera: Debido a que el Buffer de Lisis (FACS Lysing Solution, BD-Bioscience, San José, CA, USA) se presenta en concentración de 10X, se debe diluir en una solución de Agua de-ionizada en una dilución 1:10.
6. Se realizó agitado de vórtice (vórtex) ligero a cada tubo.
7. Se incubó durante 15 minutos, a temperatura ambiente, en condición de oscuridad.
8. Se realizó centrifugado durante 5 minutos, a 2000rpm, a una temperatura de 4°C.
9. Una vez terminado el centrifugado, se descartó el sobrenadante en un solo movimiento.
10. Se adicionó a cada tubo 1mL de Buffer FACS, preparado previamente de la siguiente manera: PBS al 2% de SFB (Suero Fetal Bovino) y 0,02% de Azida de Sodio.
11. Se realizó centrifugado durante 5 minutos, a 2000rpm, a una temperatura de 4°C.
12. Una vez terminado el centrifugado, se descartó el sobrenadante en un solo movimiento.
13. Finalmente, se resuspendió en 200 μ L de Buffer Paraformaldehído, preparado previamente de la siguiente manera: 4% de Paraformaldehído diluido en PBS, y se almacenan las muestras a 4°C en oscuridad hasta su adquisición por el citómetro de flujo.
14. Previo a la adquisición por citómetro de flujo, se adicionaron 200 μ L de solución Buffer FACS.

La adquisición de las células se rigió por la población enriquecida de linfocitos (50.000 eventos), seleccionados por la región 1 (R1): a partir de ésta región, se seleccionó la región 2 (R2) conformada por las células CD3+, de donde se obtuvo la población CD4+CD161+. Posteriormente de la población CD3+CD4+ (R3), se obtuvieron las células CD4+CD25+ y CD4+CD25-, y de cada población, se obtuvo las células CD161+. De la adquisición se obtuvo el valor por individuo en Porcentaje (%) de células **CD4+**, **CD4+CD161+**, **CD4+CD25+CD161+** y **CD4+CD25-CD161+**. Los datos fueron analizados por el programa Flowjo versión 8.7.

3.2 Análisis de Resultados

Dado que los datos no presentan una distribución normal Shapiro Wilk $p < 0,05$, al compararlos por grupo y entre los grupos; se realizaron pruebas no paramétricas para comparar los datos de las poblaciones de pacientes diagnosticados como sanos/gingivitis y diagnosticados con periodontitis agresiva, por el Test de Mann Whitney. Se reporta diferencias estadísticamente significativas, cuando el valor de p fue menor a 0,05 ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Características de la población

En el estudio se incluyeron 6 pacientes 3 pacientes sanos y 3 pacientes con periodontitis agresiva dentro del rango de edad de 24-45 años los cuales debían cumplir con los criterios de inclusión y exclusión antes descritos.

Luego de diligenciar la historia clínica, donde se realizó una adecuada anamnesis, se diligenció periodontograma, se clasificó a cada paciente en sano o con periodontitis agresiva, y se les realizó pruebas de laboratorio clínico (cuadro hemático, perfil lipídico, hemoglobina glicosilada y factor reumatoide), con el fin de verificar estado sistémico.

Este examen clínico mostró un índice de sangrado gingival de 20.23 para los pacientes sanos y de 56.32% en los pacientes con periodontitis agresiva, en cuanto a la profundidad del sondaje y el nivel de inserción clínica, para los pacientes sanos fue de 2.37mm y 0.52mm respectivamente, mientras los pacientes con periodontitis agresiva presentaron 4.9mm y 5.69mm, respectivamente.

Tabla 4.1.1: Análisis demográfico

Sexo		Promedio Edad		
F	M	General	Sanos	Periodontitis
2	4	30.9	27.33	34.6
Grupo de estudio				
		Periodontitis		
		Sanos	Agresiva	
Mujeres	1	1		
Hombres	2	2		
Total	6	3		

Tabla 4.1.2: Resumen de antecedentes personales reportados

Antecedentes Personales	Reportados	
Cardio-respiratorios	1	Soplo cardiaco funcional: 1
Infecciosos	0	

Inmuno-alérgicos	1	Rinitis alérgica: 1
Órganos de los sentidos	3	Miopía: 1 Astigmatismo: 2
		Miopía + Astigmatismo: Hipermetropía:
TGI / Renal / Urinario / Genital	0	
Gástricos /digestivos		Gastritis:2 Colon irritable:1
Endocrinos	1	Hipoglicemia: 1
Gineco-Obstétricos	1	Partos Normales: 1 Abortos: 0
Neurológicos / Traumatismos / Quirúrgicos / Tóxicos	4	Cirugía cálculos en la vesícula:1 Fractura Peroné: 1 Rinoplastia: 1 Fractura tibia y peroné:1 Fractura de falange: 1 Fractura muñeca: 1
Dermatológicos	1	Dermatitis por Químicos de detergentes y jabones Acne vulgaris: 1
Hematológicos / Neoplásicos	0	
Reumáticos	0	
Tratamiento Médico actual	0	

Tabla 4.1.3: Resumen antecedentes familiares según ocurrencia

Antecedentes Familiares	Padres	Abuelos	Hermanos	Otros
Artritis		*		
Cáncer de colon		*		
Cáncer de próstata		*		
Cáncer de tiroides		*		
Diabetes Mellitus II	*	**		
Enf. De Alzheimer		*		
Hipertensión Arterial	**			
Infarto Agudo de Miocardio	*	*		
Lupus Eritematoso Sistémico				*
Periodontitis	**		*	*
Vitiligo		*		*

Tabla 4.1.4: Resumen antecedentes personales específicos

	SI	Paciente	
1. Antibiótico / antiinflamatorio o últimos 6 meses	0		
2. Actual embarazo o lactancia?	0	No aplica: 5	
3. Sequedad bucal / ocular	0		
4. Hormigueo, contracción muscular, temblor, parálisis de manos - brazos	1	Hormigueo: 1	Temblor: 0
5. Piel seca, manchas, descamación, signos de lupus eritematoso sistémico o discoide	2	Ressequedad por químicos de jabones : 1	Pérdida de cabello: 1
6. Ansiedad, irritabilidad, alteraciones de memoria, migraña	0		
7. Cólicos agudos, diarrea persistente, náuseas, vómito, pérdida de peso	0		
8. Caída de músculos faciales, dificultad para tragar, respirar, masticar	0		
9. Sangre en orina ó deposiciones	1	Melena: 1	
10. Polidipsia, polifagia, poliuria	0	Poliuria: 0	Polifagia: 0
11. Reconocimiento de enfermedades autoinmunes	0		
12. Consumo de azatioprina, micofenolato, ciclofosfamida,, metrotexato, rituximab	0		
13. Consumo de Levotiroxina ó semejantes, insulinodependencia	0		

En cuanto al cuestionario HAQ para determinar manifestaciones clínicas de artritis reumatoide, ningún paciente contestó positivo a ninguna de las preguntas teniendo todos una puntuación de 0

Tabla 4.1.5: Valores promedio de las mediciones clínicas periodontales por grupo de pacientes.

	Valor Promedio	
	Sanos	Periodontitis
Profundidad de Surco o Bolsa	2.37	4.94
Nivel de Inserción Clínica	0.52	5.69
Índice de Sangrado Gingival	20.23	56.32

4.2 Análisis de resultados

Luego de realizada la historia clínica, del diligenciamiento del consentimiento informado se procede a realizar el procesamiento de la muestra, añadiendo los siguientes anticuerpos: Anti-CD161, Anti-CD3, Anti-CD4 y Anti CD25 como se planteó anteriormente en la metodología, luego de dicho procesamiento se pasa cada muestra por citometría de flujo y se obtienen los siguientes porcentajes de poblaciones celulares.

Tabla 4.2.1 Porcentaje poblaciones celulares

• Sanos

	CD4+CD161+	CD4+CD25+	CD4+CD25+CD161+	CD4+CD25-	CD4+CD25- CD161+
1	19,5	9,28	22,7	84,1	23,4
2	18,4	7,36	13,3	86,2	18,7
3	26,1	6,42	20,2	85,7	22,6
Promedio	21,33333333	7,68666667	18,73333333	85,33333333	21,56666667

• Periodontitis agresiva

	CD4+CD161+	CD4+CD25+	CD4+CD25+CD161+	CD4+CD25-	CD4+CD25- CD161+
<u>4</u>	<u>35,1</u>	<u>55</u>	<u>34,7</u>	<u>43,1</u>	<u>22,5</u>
<u>5</u>	<u>14,3</u>	<u>55,6</u>	<u>17,7</u>	<u>43,8</u>	<u>7,39</u>
<u>6</u>	<u>33,3</u>	<u>45,1</u>	<u>35,7</u>	<u>53,1</u>	<u>26,7</u>
<u>Promedio</u>	<u>27,56666667</u>	<u>51,9</u>	<u>29,36666667</u>	<u>46,66666667</u>	<u>18,86333333</u>

Teniendo en cuenta a los autores Linbo Li y col donde evalúan las subpoblaciones de Th17 en Síndrome de Sjögren primario se realizan los siguientes analisis.

Primero de evaluaron los niveles porcentuales de linfocitos TH17 en los pacientes con enfermedad periodontal y en pacientes sanos o con gingivitis asociada a placa bacteriana, partir del recuento de leucocitos totales, y del promedio en porcentaje por población celular tomando como referencia los marcadores CD4⁺ CD161⁺, se encontró un porcentaje promedio 21, 33 en pacientes sanos o con gingivitis y 27,56 en pacientes con periodontitis agresiva, estos resultados arrojaron un. P value = 0,70, aunque los resultados no son significativos se puede inferir en una presencia más alta de Th17 en pacientes con presencia de enfermedad periodontal agresiva activa en comparación con los controles. (Figura 4.2.2)

En la figura 4.2.1, se representa la manera como fueron adquiridas las células CD4+CD161+.

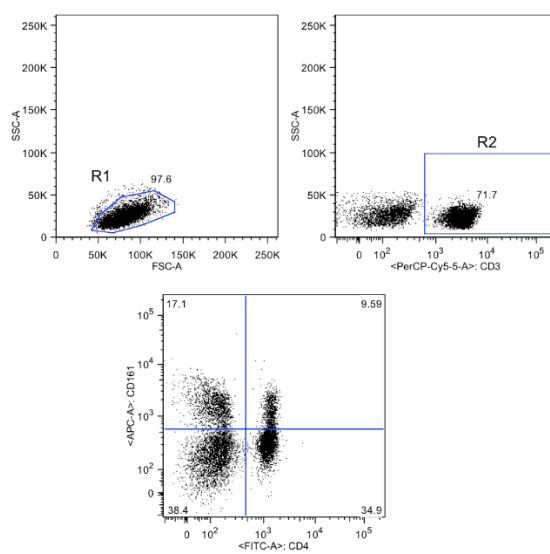
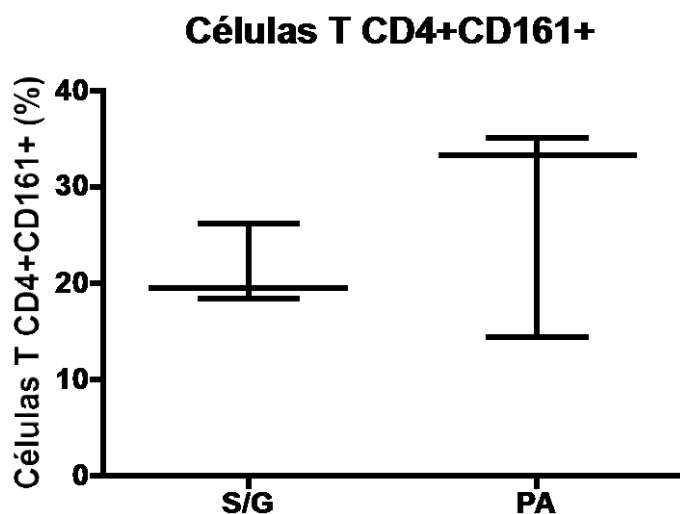


Figura 4.2.1. Figura representativa de las células CD4+CD161+.por citometría de flujo. La adquisición de las células se rigió por la población enriquecida de linfocitos (50.000 eventos), seleccionados por la región 1 (R1): a partir de esta región, se seleccionó la región 2 (R2) conformada por las células CD3+, de donde se obtuvo la población CD4+CD161+ en el cuadrante superior derecho. La imagen es un dot blot por citometría de flujo.

Figura 4.2.2: Test de Mann Whitney Análisis comparativo de la expresión de células T CD4⁺ CD161⁺ entre pacientes sanos o con Gingivitis Inducida por Placa Bacteriana y diagnosticados con Periodontitis agresiva a partir del recuento de leucocitos totales, y del promedio en porcentaje por población celular. P value = 0,70.



Después se midieron los niveles porcentuales de linfocitos TH17 efectores y Th17 reguladores en los pacientes con enfermedad periodontal y en pacientes sanos o con gingivitis asociada a placa bacteriana, partir del recuento de leucocitos totales, y del promedio en porcentaje por población celular tomando como referencia los marcadores CD4+CD25-CD161+ para la población Th17 efectora y CD4+CD25+CD161+ para la población de Th17 reguladora.

Se encontró un porcentaje promedio de población de Th17 reguladora de 18.73 en pacientes sanos o con gingivitis y 29,36 en pacientes con periodontitis agresiva, estos resultados arrojaron un. P value = 0,70, aunque los resultados no son significativos se puede inferir en una presencia más alta de Th17 en pacientes con presencia de enfermedad periodontal agresiva activa en comparación con los controles. (figura 4.2.4)

En cuanto a la población Th17 efectora, se encontró un porcentaje promedio de 21,56 en pacientes sanos o con gingivitis y 18,86 en pacientes con periodontitis agresiva, estos resultados arrojaron un. P value = 1,00. Los resultados no son significativos, se muestra una subpoblación efectora estable tanto en los pacientes sanos como en los pacientes con periodontitis agresiva, lo que puede llevar a pensar que esta población no esta jugando un rol importante en la patogénesis de la enfermedad. (figura 4.2.5)

En la figura 4.2.3 se representa la escogencia de la población de células CD4+CD25+CD161+ y la CD4+CD25-CD161+

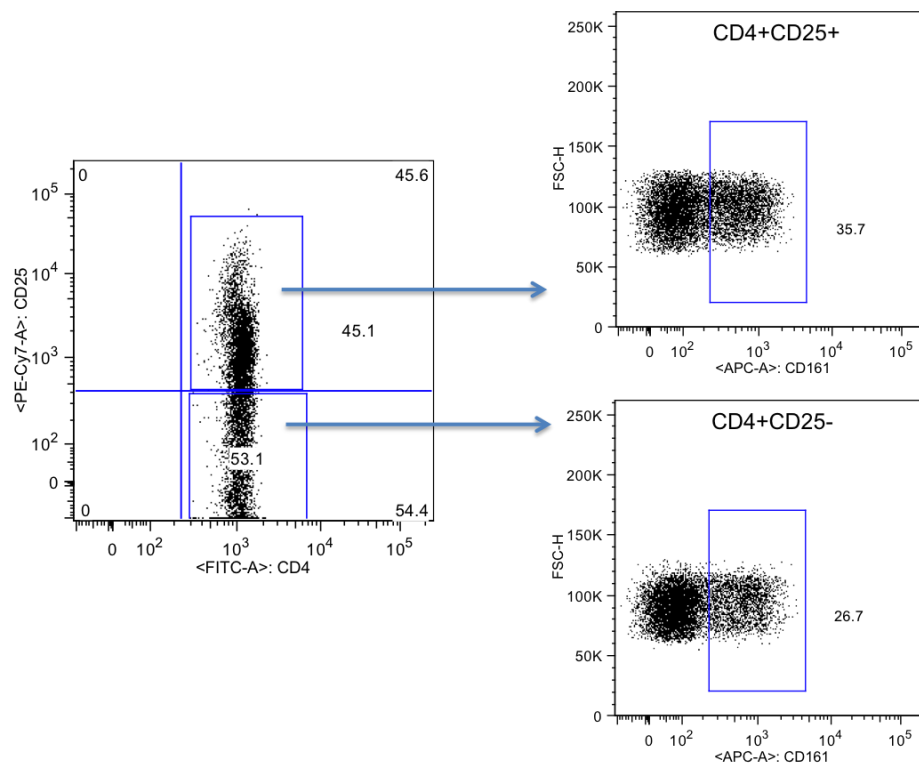


Figura 4.2.3. Representación de la adquisición de células CD4+CD25+CD161+ Y CD4+CD25-CD161+. Las células representadas, fueron obtenidas de la R1 enriquecida y de la R2. De la población CD3+CD4+, se obtuvieron las células CD4+CD25+ y CD4+CD25-, y de cada población, se obtuvo las células CD161+. La imagen es un dot blot por citometría de flujo.

Figura 4.2.4: Test de Mann Whitney Análisis comparativo de la expresión de células T CD4⁺ CD161⁺ CD25⁺ entre pacientes sanos o con Gingivitis Inducida por Placa Bacteriana y diagnosticados con Periodontitis agresiva a partir del recuento de leucocitos totales, y del promedio en porcentaje por población celular. P value = 0,40.

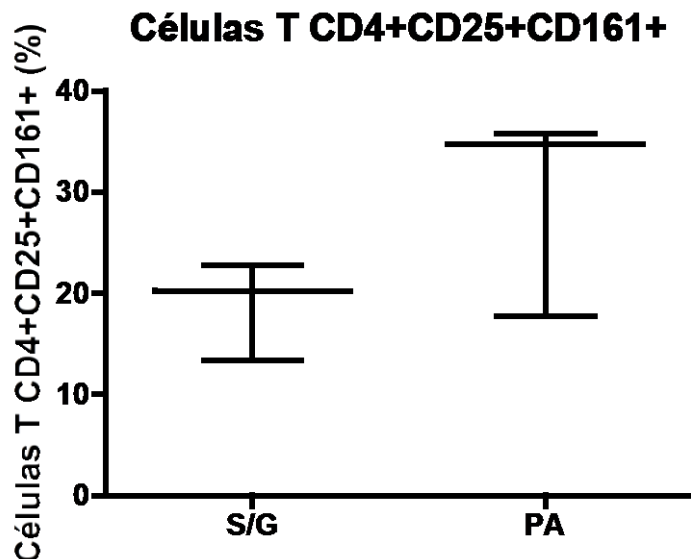
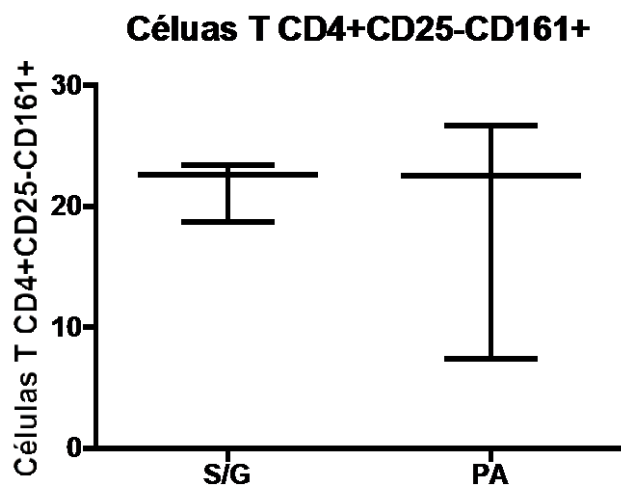


Figura 4.2.5: Test de Mann Whitney Análisis comparativo de la expresión de células T CD4⁺ CD161⁺ CD25⁻ entre pacientes sanos o con Gingivitis Inducida por Placa Bacteriana y diagnosticados con Periodontitis agresiva a partir del recuento de leucocitos totales, y del promedio en porcentaje por población celular. P value = 1,00



5. Discusión

Se ha encontrado que las citoquinas producidas por las células Th17 juegan un rol importante en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, psoriasis, síndrome de Sjögren, entre otras^{6,9,30,31}, adicionalmente es claro que en enfermedad periodontal también tienen un rol importante en la patogénesis de la misma.

En enfermedad periodontal la mayoría de estudios evalúan la presencia de interleuquina 17^{2,13}, sin embargo, como se sabe esta interleuquina no es solo producida por células Th17, también es producida por leucocitos polimorfos nucleares y células natural killer. Por tanto, es necesario identificar no solo la presencia de IL-17 sino también la presencia de Th17 productoras de esta, algunos estudios en periodontitis crónica han determinado la presencia de este perfil de células Th con marcadores específicos³³. Pero ningún estudio ha evaluado las subpoblaciones de Th17 en enfermedad periodontal.

Algunos estudios que evalúan la presencia de IL-17 y por tanto infieren en la presencia de células Th17 son los estudios de Takahashi y col. (2005) quienes tomaron 39 biopsias de 23 pacientes con periodontitis sometidos a cirugía periodontal y midieron la presencia de IL-17, donde detectaron una expresión moderada de mRNA de IL17, la cual podría estar involucrada en la modulación de la Th1 y por tanto aumentar la respuesta inflamatoria derivada de mediadores fibroblásticos de la enfermedad periodontal.³⁴

Lester y col. 2007 observaron la concentración de IL-23 e IL-17 en pacientes sanos y pacientes con pérdida de inserción moderada y severa, hallaron un aumento en la presencia de las mismas en pacientes con pérdida de inserción moderada

⁶ Kleinewietfeld M., Hafler D. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2013;25:305–12.

⁹ Maddur MS, Miossec P, Kaveri S V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol.* 181(1):8–18.

³⁰ Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;1–10

³¹ Li L, He J, Zhu L, Yang Y, Jin Y, Jia R, et al. The Clinical Relevance of IL-17-Producing CD4⁺CD161⁺ Cell and Its Subpopulations in Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res.* 2015;1–15.

³⁴ Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2005;32:369–74.

comparada con pacientes sanos, y una presencia más fuerte en pacientes con pérdida de inserción severa comparada con los pacientes que presentaban una pérdida de inserción moderada³⁵.

Cardoso y col (2009), Midieron la presencia de IL-17, IL-23 y RANKL en pacientes con periodontitis crónica y encontraron un aumento de estas comparada con pacientes sanos y relacionaron el aumento de RANKL a la elevada producción de IL-17, la cual induce la expresión de este y por tanto podía inferirse que estaba involucrada en el desarrollo y aumento de la reabsorción ósea³.

Adibrad y col. (2012), en 30 pacientes con periodontitis crónica y 30 pacientes sanos evaluaron la presencia de IL-17 y la expresión del factor de transcripción homólogo a ROR γ t en humanos RORC2, como marcador específico de células Th17, encontrando la presencia de ambos tanto en pacientes con periodontitis como en los controles, pero con un aumento significativo de ambos en los primeros³³.

En periodontitis agresiva Duarte y col. (2010), realizaron un estudio piloto donde analizaron la presencia en suero de IL-17 en pacientes con periodontitis crónica y agresiva antes y después de la terapia periodontal, hallaron un aumento de la presencia de IL-17 en pacientes con enfermedad periodontal, la cual era mayor en pacientes con periodontitis agresiva en comparación a los pacientes con periodontitis crónica, adicionalmente encontraron que esta disminuía luego de realizada la terapia periodontal³⁶.

Schenkein y col. 2010. Observaron la expresión de IL-17 en pacientes con periodontitis agresiva localizada y generalizada y encontraron una mayor expresión de esta comparada con pacientes sanos, esta presencia aumentaba en pacientes que tenían periodontitis agresiva generalizada comparada con los pacientes que tenían periodontitis agresiva localizada¹⁰.

³Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;(24):1–6.

³³ Adibrad M, Deyhimi P, Hakemi G, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2012;1–7

³⁵ Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival Concentrations of Interleukin-23 and -17 at Healthy Sites and at Sites of Clinical Attachment Loss. *J Periodontol*. 2007;78(8):1545–50.

³⁶ Duarte PM, Rocha M da, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum Levels of Cytokines in Subjects With Generalized Chronic and Aggressive Periodontitis Before and After Non-Surgical Periodontal Therapy: A Pilot Study. *J Periodontol*. 2010;81:1056–63.

Resultados contrarios presentaron Zhual y col. (2012) quienes evaluaron la presencia de IL-17 e IL-11 en el fluido crevicular de 20 pacientes con periodontitis agresiva generalizada, estos encontraron una presencia disminuida de las mismas en comparación con pacientes sanos, la cual no tuvo resultados significativos².

No se encontró ningún estudio parecido al nuestro en enfermedad periodontal agresiva sin embargo basándonos en el estudio realizado por Linbo y col (2015). Los cuales evaluaron los valores en suero de las subpoblaciones de Th17, las “reguladoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁺) y las “efectoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻), de pacientes con síndrome de Sjögren primario y determinaron que las células T CD4⁺ CD161⁺ eran capaces de producir más IL-17 en comparación a su contraparte CD161⁻, también encontraron que la subpoblación reguladora T CD4⁺ CD161⁺ estaba aumentada en pacientes con este síndrome cuando presentaban anormalidades en las funciones de Treg. Los niveles circulantes de CD4⁺ CD161⁺ se asociaron positivamente a parámetros de actividad de la enfermedad y presencia de anticuerpos. Concluyeron que la IL-17 producida por las células T CD4⁺ CD161⁺ desempeñan un rol importante en el desarrollo de la inflamación y activación de células B en el síndrome de Sjögren primario³¹. En nuestro estudio no se encontraron valores significativos se hallaron niveles mas altos de de subpoblaciones de Th17 reguladoras en pacientes con periodontitis agresiva y se encontraron niveles estables de Th17 efectora, lo que la diferenciaría de una enfermedad autoinmune donde la Th17 está cumpliendo roles patogénicos y se llevaría a pensar que enfermedad periodontal está cumpliendo un rol regulador.

En el estudio se encontraron CD8⁺ CD161⁺. Esto se correlaciona con el hallazgo de células no convencionales de memoria residentes en tejido como la piel y el intestino dentro del fenotipo CD8⁺ las cuales expresan CD161⁺ y al estar dentro del tejido pueden proveer rápida protección. (CD161⁺ CD8⁺). Este fenotipo en particular de CD8⁺ se ha visto ser análogo a las células Th17. Billerbeck y col. (2009), quienes encontraron un alto índice de estas en pacientes con hepatitis C las cuales co-expresaban IL-17 con altos niveles de IFN-γ y/o IL-22, este tipo celular podría por tanto estar jugando un rol importante en enfermedades inflamatorias³⁷.

²Ay ZY, Yilmaz G, Özdem M, Kocxak H, Sütçü R, Uskun E, et al. The Gingival Crevicular Fluid Levels of Interleukin-11 and Interleukin-17 in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2012;1425–31

¹⁰Schenkein H, Koertge T, Brooks C, Sabatini R, Purkall D, Tew J. IL-17 in Sera from Patients with Aggressive Periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(9):943–7.

³¹Li L, He J, Zhu L, Yang Y, Jin Y, Jia R, et al. The Clinical Relevance of IL-17-Producing CD4⁺CD161⁺ Cell and Its Subpopulations in Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res*. 2015;1–15

³⁷Billerbeck E, Kang Y, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8+ Tcells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. PNAS. 2010;107(7):3006–11

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los resultados que arrojo esta investigación no fueron estadísticamente significativos, sin embargo, en pacientes con periodontitis agresiva se encontraron niveles más altos de células Th17 del tipo regulador, lo que lleva a pensar que enfermedad periodontal agresiva las células están jugando un papel protector ante el desafío microbiano y ante la hiper-respuesta de los otros tipos celulares del huésped.

Esto se corrobora con el hallazgo de niveles estables de las subpoblaciones de Th17 “efectoras” (CD4⁺, CD161⁺, CD25⁻) en pacientes con periodontitis agresiva y en pacientes sanos, por lo que se infiere que estos no están jugando un rol patológico en el desarrollo de la enfermedad.

6.2 Recomendaciones

El presente estudio arroja resultados interesantes, pero no estadísticamente significativos, por lo que se recomienda aumentar el tamaño de la muestra para corroborar estos hallazgos, así mismo se sugiere la comparación con pacientes con enfermedad periodontal crónica, porque aunque existen estudios que verifican al aumento de Th17 en estos pacientes, falta relacionar las subpoblaciones presentes, como se realizó en este estudio. De igual forma se recomienda continuar con la investigación y enriquecer la misma estudiando la producción de citoquinas, y confirmar los perfiles celulares.

7. Anexos

7.1 Anexo 1: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del paciente _____

CC: _____

Edad: _____ Fecha: _____

Proyecto: Caracterización de subpoblaciones de Th17 en sangre periférica en pacientes con periodontitis agresiva

Se le está invitando a participar en este estudio de investigación odontológica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados así como los procedimientos que se le realizarán y los fines de los mismos. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

La periodontitis agresiva es un tipo de enfermedad que afecta los tejidos periodontales, es decir los tejidos de soporte del diente (Encía, Ligamento periodontal, hueso alveolar) de rápida progresión, que lleva a una inflamación significativa oral y pérdida prematura de dientes. Aun no se tiene claro la inmunopatogénesis de la misma, es decir cómo actúa el sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, pero se ha visto que las citoquinas (son [proteínas](#) que regulan la función de las [células](#) que las producen sobre otros tipos celulares) juegan un rol importante en la modulación de la respuesta inmune.

Se ha observado recientemente un posible rol de las células Th17 como productoras de citoquinas proinflamatorias “destructoras” de tejido o cumpliendo funciones antagónicas como reguladoras, el entendimiento de estas puede llevar a un entendimiento más claro, de la enfermedad, así como llevar a otros enfoques en el tratamiento.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio este consta de las siguientes fases:

1. Historia clínica: se realizara la anamnesis (algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, sus antecedentes médicos, historia familia de la enfermedad)
2. Examen clínico periodontal: Se determinara el diagnóstico periodontal.
3. Toma de dos muestras de sangre periférica con una sola venopunción:
 - Primera: Se someterá a cuatro pruebas de laboratorio: Cuadro hemático, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico y factor reumatoideo. Esto con el fin de descartar algún tipo de patología en su cuerpo. De encontrarse algo anormal en sus exámenes, será informado de inmediato para tomar las medidas respectivas.
 - Segunda: Permitirá determinar el número y subtipos de linfocitos Th17 en su sangre a través de diferentes pruebas de laboratorio.
4. Análisis de los resultados.

RIESGOS relacionados a la venopunción:

- Hemorragia
- Lipotimia
- Síncope
- Hematoma
- Infección
- Laceración de tejidos blandos
- Punciones múltiples

Se pueden presentar riesgos impredecibles que escapan al conocimiento del investigador.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable ni represalias para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede firmar y dar su consentimiento

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Paciente:
Identificación:

Director: Dra. Lina Suárez.

Co-Director: Dra. Nelly Roa

Estudiante: Johanna Carolina Camacho R.

7.2 Anexo 1: Historia Clínica

HISTORIA CLÍNICA - PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE TH17 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON PERIODONTITIS AGRESIVA

Encargado: JOHANNA CAROLINA CAMACHO RAMÍREZ –Residente Especialidad en Periodoncia.

Directora: Dra. LINA J. SUÁREZ LONDOÑO.

Co-Directora: Dra. NELLY STELLA ROA MOLINA.

ALERTA MÉDICA: _____

FECHA DE DILIGENCIAMIENTO:		
DOCUMENTO:		
APELLIDOS:		SEXO: M: ____ F: ____
NOMBRES:		EDAD:
OCUPACIÓN:		ESTADO CIVIL:
DIRECCIÓN:		TELÉFONO:
E-MAIL:		CELULAR:
EPS / PREPAGADA:		VINCULACIÓN:
ACUDIENTE:		TELÉFONO:
PARENTESCO:		

MOTIVO DE CONSULTA: _____

ANAMNESIS PRÓXIMA:

ANTECEDENTES	SI	NO	ESPECIFIQUE LOS ANTECEDENTES QUE EL PACIENTE REFIERA
1. Cardiovasculares			
2. Respiratorios.			
3. Infecciosos.			
4. Alérgicos.			

5. Órganos de los sentidos			
6. Gástricos, Digestivos.			
7. Renales – Urinarios.			
8. Genitales.			
9. Dermatológicos			
10. Inmunológicos.			
11. Endocrinológicos.			
12. Gineco-obstétricos.			
13. Neurológicos.			
14. Traumatismos.			
15. Quirúrgicos.			
16. Tóxicos.			
17. Neoplásicos.			
18. Irradiaciones.			
19. Hematológicos.			
20. Reumáticos.			
21. Transfusiones.			
22. Antecedentes Orales.			
23. Cirugía Oral.			
24. Tto Médico Actual.			Motivo: Fecha último control:
Médico tratante: Teléfono:			
25. Medicamentos en uso.			
26. Anteced. Familiares.			
27. Otros.			

¿Ha recibido usted formulación antibiótica, antiinflamatoria ó con corticosteroides en los últimos seis meses? SI _____ NO _____

Si es mujer, ¿se encuentra embarazada ó en período de lactancia? SI____ NO ____

RESPONDA A LAS SIGUIENTES PREGUNTAS: Usted, o algún familiar (¿Quién?)

1. ¿Padece de Sequedad Ocular ó bucal? _____
2. ¿Presenta o ha presentado de modo constante hormigueos, contracciones musculares en brazos o manos, temblores, parálisis? _____

3. Presenta ó ha presentado: piel seca, descamación, rasquiña, pérdida del cabello; aparición de ampollas ó úlceras en la boca ó la piel; enrojecimiento de la cara sobre las mejillas, de la nariz ó de la barbilla; manchas elevadas en la piel, manchas rojas redondeadas y levantadas con escamas? _____

4. Presenta ó ha presentado: ansiedad, irritabilidad, alteraciones de la memoria, ¿dolores de cabeza continuos? _____

5. Presenta ó ha presentado: cólicos agudos, diarrea persistente, náuseas, vómito a repetición, pérdida de peso? _____

6. Presenta ó ha presentado: pérdida de visión, caída de los párpados; problemas para caminar; dificultad para tragar, masticar, respirar? _____

7. Presenta ó ha presentado: sangre en la orina ó en las deposiciones;? Se conoce la causa de ello? _____

8. Ha notado un aumento en la sed, micción (orina), apetito? De ser así, qué miembro de su familia lo presenta y qué edad tiene la persona que lo refiere? _____

9. Recuerda si algún familiar ha sido diagnosticado con alguna de las siguientes enfermedades?: Anemia Perniciosa, Artritis Reumatoide, Dermatitis, Dermatomiositis, Cirrosis Biliar, Celiacía, Colangitis, Colitis, Diabetes

Mellitus Tipo I, Enfermedad de Crohn, Enfermedad de Graves, Enfermedad de Behçet, Esclerodermia, Esclerosis Múltiple, Espondiloartropatía, Fibromialgia, Granulomatosis de Wegener, Hepatitis Autoinmune, Lupus Eritematoso Sistémico, Miastenia Gravis, Mixedema primario, Oftalmía simpática, Pénfigo Vulgar, Polimiositis, Psoriasis, Síndrome antifosfolípidos, Síndrome de Fatiga Crónica, Síndrome de Guillain-Barré, Síndrome de Sjögren, Vasculitis Sistémica, Tiroiditis de Hashimoto, Uveitis, Vitiligo. _____

10. Consume o ha consumido alguno de los siguientes medicamentos: metrotexato, azatioprina, micofenolato, ciclofosfamida, rituximab? _____

11. Consume medicamentos para el manejo de Enfermedades de glándula tiroides, paratiroides? O Debe ser inyectado con insulina? _____

12. Favor responder el cuestionario HAQ para signos de artritis reumatoide.

HALLAZGOS INTRAORALES:

Total dientes en Boca: _____

DENTALES / ENDODÓNTICOS : _____

PERIODONTALES: _____

TEJIDOS DUROS Y BLANDOS: _____

RESULTADO DE PRUEBA – FACTOR REUMATOIDEO / INTERPRETACIÓN: _____

DIAGNÓSTICOS:

Diagnóstico periodontal principal: _____

Diagnósticos adicionales: _____

TRATAMIENTOS REQUERIDOS:_____

RESULTADO – ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE MUESTRA DE SANGRE:_____

7.3 Anexo 2: Cuestionario (HAQ)

Versión Española del Health Assessment Questionnaire (HAQ)

Traducida y adaptada por J. Esteve-Vives, E. Batlle-Gualda, A. Reig y Grupo para la Adaptación del HAQ a la Población Española

	Durante la <u>última semana</u> , ¿ha sido usted capaz de...	Sin dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	Incapaz de hacerlo
	1) Vestirse solo, incluyendo abrocharse los botones y atarse los cordones de los zapatos?				
	2) Enjabonarse la cabeza?				
	3) Levantarse de una silla sin brazos?				
	4) Acostarse y levantarse de la cama?				
	5) Cortar un filete de carne?				
	6) Abrir un cartón de leche nuevo?				
	7) Servirse la bebida?				
	8) Caminar fuera de casa por un terreno llano?				
	9) Subir cinco escalones?				
	10) Lavarse y secarse todo el cuerpo?				
	11) Sentarse y levantarse del retrete?				
	12) Ducharse?				
	13) Coger un paquete de azúcar de 1 Kg de una estantería colocada por encima de su cabeza?				
	14) Agacharse y recoger ropa del suelo?				
	15) Abrir la puerta de un coche?				
	16) Abrir tarros cerrados que ya antes habían sido abiertos?				
	17) Abrir y cerrar los grifos?				
	18) Hacer los recados y las compras?				


0 0.000 1
0.125 2
0.250 3
0.375 4
0.500 5
0.625 6
0.750 7
0.875 8
1.000
9 1.125
10 1.250
11 1.375
12 1.500
13 1.625
14 1.750
15 1.875
16 2.000
17 2.125
18 2.250
19 2.375
20 2.500

19) Entrar y salir de un coche?				
20) Hacer tareas de casa como barrer o lavar los platos?				

Señale para qué actividades **necesita la ayuda de otra persona**:


 .. Vestirse, asearse


 .. Caminar, pasear

 .. Abrir y cerrar cosas
(prensión)

 .. Levantarse


 .. Higiene personal

 .. Recados y tareas de casa


 .. Comer

 .. Alcanzar

Señale si utiliza alguno de estos **utensilios** habitualmente:

 .. Cubiertos de mango ancho

 .. Abridor para tarros previamente abiertos

 .. Bastón, muletas, andador o silla de ruedas

 .. Asiento o barra especial para el baño

 .. Asiento alto para el retrete

Puntuación del cuestionario de discapacidad HAQ

Primero. En cada una de las 8 áreas (vestirse y asearse, levantarse, comer,...) del cuestionario escoger la **puntuación más alta** de los 2 ó 3 ítems que la componen, por lo que se obtienen 8 puntuaciones. Así, los 20 ítems iniciales quedan reducidos a 8.

Ejemplo,

Si en el área **c) comer** el enfermo ha contestado lo siguiente:

¿Es usted capaz de...

1.- Cortar un filete de carne?

[1] (con alguna dificultad)

2.- Abrir un cartón de leche nuevo?

[2] (con mucha dificultad)

3.- Servirse la bebida?

[0] (sin dificultad)

La puntuación elegida será dos [2]. Es decir, el valor más alto de los tres ítems que componen el área c) comer.

En todas las áreas en que se obtenga una puntuación de [2] ó [3] no es necesario mirar las preguntas correctoras.

Segundo. Mirar las preguntas correctoras. Muchas personas se confunden en este punto. La labor se facilita si se comprende el significado de las preguntas correctoras. Su finalidad es evitar puntuaciones demasiado bajas que se producen si la enferma responde que hace sus actividades sin dificultad [0] o con alguna dificultad [1], pero reconoce que precisa ayuda de otra persona o algún tipo de utensilio o ayuda técnica para realizar esas mismas actividades.

Si un área obtiene una puntuación de [2] ó [3] no es necesario mirar las preguntas correctoras. Pero si en esa área se obtiene una puntuación, de [0] ó [1], se deberá corregir la puntuación si la enferma contestó que precisaba de la **ayuda de otra persona** o de algún **utensilio** para realizar cualquiera de las actividades incluidas en dicha área –basta con que sólo sea una–. En ese caso la puntuación inicial del área de [0] ó [1] se convierte en [2], pero nunca en [3].

Ejemplo,

Si en el área “**d) caminar**” el enfermo ha contestado:

¿Es usted capaz...

- 1.- Caminar fuera de casa por un terreno llano? [0] (sin dificultad)
- 2.- Subir cinco escalones? [1] (con alguna dificultad)

Pero más abajo ha indicado que utiliza muletas, la puntuación del área “caminar” será [2] en vez de [1].

Tercero. Calcular la media. Hallar la media de los 8 valores correspondientes a las 8 áreas descritas: a) vestirse, b) levantarse, c) comer,... h) otras actividades. Esa será la puntuación final del cuestionario de capacidad funcional HAQ.

La puntuación del HAQ puede oscilar entre 0 (no incapacidad) y 3 (máxima incapacidad). En el caso de no contestar algún ítem se asigna el valor más alto de los restantes ítems que formen dicha área. Si hubiera una o dos áreas completas sin respuesta la suma de las 7 u 6 áreas restantes se dividiría por 7 u 6, respectivamente, para obtener el valor medio, que estará entre cero y tres [0-3]. Un cuestionario con menos de 6 áreas contestadas, carece de validez.

8. Bibliografía

- (1)1. Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:111–23.
2. Ay ZY, Yılmaz G, Özdem M, Kocxak H, Sütçü R, Uskun E, et al. The Gingival Crevicular Fluid Levels of Interleukin-11 and Interleukin-17 in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2012;1425–31.
3. Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;(24):1–6.
4. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature*. 2008;453:1051–1057.
5. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016;1–9.
6. Kleinewietfeld M., Hafler D. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25:305–12.
7. Singh B, Schwartz JA, Sandroock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J Med Res*. 2013;138(5):591–584.
8. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front Immunol*. 2014;5:1–13.

9. Maddur MS, Miossec P, Kaveri S V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. 181(1):8–18.
10. Schenkein H, Koertge T, Brooks C, Sabatini R, Purkall D, Tew J. IL-17 in Sera from Patients with Aggressive Periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(9):943–7.
11. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect*. 2009;11:625–30.
12. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32:383–9.
13. Cheng W, Hughes F, Taams L. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41:541–9.
14. Lang NP, Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implan Dentistry*. Sixth Edit. Wiley Blackwell; 2015.
15. Suárez L, Roa N, Vargas D. Expresión de Linfocitos T CD4+ Th17 en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con Periodontitis Crónica. *Univ Nac Colomb Fac Ododnología*. 2014;
16. Page RC, Schroeder HE. Current Status of the Host Response in Chronic Marginal Periodontitis. *J Periodontol*. 1981;52(9):477–91.
17. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8–20.
18. Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann od Periodontol*. 1999;4(1):53.

19. Nibali L. Aggressive Periodontitis: microbes and host response, who to blame? *Virulence*. 2015;6(3):223–8.
20. Kantarci A, Oyaizu K, Dyke TE Van. Neutrophil-Mediated Tissue Injury in Periodontal Disease Pathogenesis: Findings from Localized Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2003;74:66–75.
21. Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godbole D, et al. Macrophage Inflammatory Protein-1 α Shows Predictive Value as a Risk Marker for Subjects and Sites Vulnerable to Bone Loss in a Longitudinal Model of Aggressive Periodontitis. *PLoS One*. 2014;9(6):1–11.
22. Hwang AM, Stoupel J, Celenti R, Demmer RT, Papapanou PN. Serum Antibody Responses to Periodontal Microbiota in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Postulate Revisited. *J Periodontol*. 2014;85(4):592–600.
23. Suarez. LJ, Ocampo AM, Dueñas RE, Rodríguez A. Relative Proportions of T-Cell Subpopulations and Cytokines That Mediate and Regulate the Adaptive Immune Response in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75(9):1209–15.
24. Elabdeen HRZ, Mustafa M, Ali R, Bolstad AI. Cytokine profile in gingival crevicular fluid and plasma of patients with aggressive periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 2017;1–6.
25. Teles¹ RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles¹ FRF, Feres M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010;37:313–23.
26. Albandar JM, Tinoco EMB. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000*. 2002;29:153–76.
27. Social M de SYP. IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB - IV 2013-2014. Ministerio Salud y Prot Soc. 2015;

28. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* 2012;13(991–1001).
29. Cosmi L, De Palma R aele, Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17 –producing cells originate from a CD161 + CD4 +T cell precursor. *J Exp Med.* 2008;205(8):1903–16.
30. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;1–10.
31. Li L, He J, Zhu L, Yang Y, Jin Y, Jia R, et al. The Clinical Relevance of IL-17-Producing CD4+CD161+ Cell and Its Subpopulations in Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res.* 2015;1–15.
32. Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta.* 2008;395:137–41.
33. Adibrad M, Deyhimi P, Hakemi G, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2012;1–7.
34. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2005;32:369–74.
35. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival Concentrations of Interleukin-23 and -17 at Healthy Sites and at Sites of Clinical Attachment Loss. *J Periodontol.* 2007;78(8):1545–50.
36. Duarte PM, Rocha M da, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum Levels of Cytokines in Subjects With Generalized Chronic and Aggressive Periodontitis Before and After Non-Surgical Periodontal Therapy:

- A Pilot Study. *J Periodontol*. 2010;81:1056–63.
37. Billerbeck E, Kang Y, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8+ Tcells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *PNAS*. 2010;107(7):3006–11.